

# 环巴胺对佐剂性关节炎大鼠关节软骨细胞增殖凋亡的影响及其抗凋亡机制

丁婧<sup>1</sup> 李荣<sup>2</sup> 胡向阳<sup>1</sup> 蔡莉<sup>1</sup> 张晓亮<sup>3</sup> 汪巧<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究 Hedgehog (Hh) 信号通路阻断剂环巴胺对佐剂性关节炎 (AIA) 大鼠关节软骨细胞增殖凋亡的影响及抗凋亡机制。方法 弗氏完全佐剂诱导 AIA 大鼠模型, 胰酶-胶原酶法分离培养关节软骨细胞, 环巴胺体外给药处理 AIA 软骨细胞, MTT 法检测细胞增殖, DNA 电泳、Hoechst 染色、Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡, RT-PCR 检测 Shh、Gli1、Ptc1、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 的表达。结果 环巴胺 (0.08、0.4、2、10、50  $\mu\text{mol/L}$ ) 剂量依赖性地提高 AIA 软骨细胞增殖。AIA 组可见凋亡细胞 DNA 梯状条带, 环巴胺 (0.4、2、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 给药组的梯状条带明显减少; AIA 组存在核碎裂与染色质固缩, 环巴胺给药组均匀蓝色荧光的细胞数量增多; 流式分析结果表明 AIA 软骨细胞凋亡率显著升高, 环巴胺明显减少细胞凋亡率; 与正常组相比, AIA 组软骨细胞中 Hh 信号通路相关基因 (Shh、Ptc1、Gli1) mRNA 表达显著升高, 抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 表达显著下降, 而促凋亡基因 Bax、Caspase-3 mRNA 表达明显升高。环巴胺体外给药能抑制 Hh 信号通路过度活化, 提高 Bcl-2 mRNA 表达, 并降低 Bax、Caspase-3 mRNA 表达。结论 环巴胺体外给药能促进 AIA 软骨细胞的增殖, 并抑制 AIA 软骨细胞的过度凋亡; 该抗凋亡作用和调节 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 表达密切相关, 提示干预软骨细胞 Hh 信号通路对保护类风湿性关节炎关节软骨具有潜在的治疗意义。

**关键词** Hedgehog 信号通路; 环巴胺; 佐剂性关节炎; 关节软骨细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 593.22; R 967

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)04-0446-06

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种自身免疫性炎症性疾病, 以滑膜慢性炎症为特点, 最终导致关节软骨及周围组织的破坏<sup>[1]</sup>。软骨损伤与 RA 严重程度和预后密切相关, 保护软骨功能、遏止软骨破坏, 能阻逆 RA 病理进程、降低 RA 致残

率<sup>[2-3]</sup>。既往 Hedgehog (Hh) 信号通路的研究<sup>[4-5]</sup>集中在胚胎期组织分化发育调节及肿瘤形成机制, 该通路在软骨细胞的增殖和分化、骨形成与骨代谢等生理和病理过程中亦发挥复杂调控作用。研究<sup>[6-7]</sup>表明 Hh 信号通路在骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 关节软骨中异常激活, 与 OA 软骨破坏程度密切相关, 抑制该通路能明显缓解病情。RA 与 OA 具有相似的软骨病理变化和临床症状, 抑制 Hh 信号通路能否用于 RA 治疗的类似研究至今未见报道。佐剂性关节炎 (adjuvant-induced arthritis, AIA) 的病理过程和实验室指标与 RA 相似, 是研究 RA 发病机制和筛选 RA 治疗药物的经典动物模型。该研究以 AIA 大鼠关节软骨细胞为研究对象, 探讨 Hh 信号通路阻断剂环巴胺体外给药对其增殖凋亡的影响及可能机制, 为防治 RA 尤其是保护 RA 关节软骨提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SD 大鼠, 清洁级, 雄性, 180~200 g, 由安徽医科大学实验动物中心提供; 自由摄食和饮水, 适应性饲养 1 周后使用。

**1.2 药物与试剂** 环巴胺 (美国 LC 实验室); 弗氏完全佐剂 (美国 Chondrex 公司); MTT 细胞增殖检测试剂盒、DNA 抽提试剂盒、Hoechst 33342 染色液 (上海碧云天生物技术研究所); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (上海贝博生物公司); TRIzol (美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒 (立陶宛 Fermentas 公司); PCR 试剂盒 (美国 Promega 公司); 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

**1.3 大鼠 AIA 模型制备** 参考文献<sup>[8]</sup>方法, 右后足趾皮内注射 0.1 ml 弗氏完全佐剂致炎作为 AIA 大鼠, 注射同体积的生理盐水作为正常大鼠。

**1.4 胰酶-胶原酶法分离培养大鼠关节软骨细胞及鉴定** 参考文献<sup>[9]</sup>方法, 分离大鼠关节表面软骨, 37  $^{\circ}\text{C}$  胰酶和 0.2% II 型胶原酶分别消化 40 min 和 3 h。200 目滤网过滤收集消化液, 1 500 r/min 离心 10 min, PBS 清洗, 共 3 次。收集细胞, 加入含

2014-12-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81102273); 教育部博士学科点专项科研基金 (编号: 20113420120005)

作者单位: 安徽医科大学<sup>1</sup> 病理学教研室、<sup>2</sup> 药学院, 合肥 230032

<sup>3</sup> 安徽省立医院病理科, 合肥 230032

作者简介: 丁婧, 女, 硕士研究生;

胡向阳, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yf-hxy2013@163.com

10%胎牛血清的DMEM培养液,吹打均匀后移入25 cm<sup>2</sup>培养瓶,培养48 h后换液除去未贴壁细胞,当原代培养的细胞连成片时进行传代培养。本实验中所用细胞为传1~3代的关节软骨细胞,并采用II型胶原免疫细胞化学染色和甲苯胺蓝染色进行鉴定。

**1.5 MTT法检测关节软骨细胞的增殖反应** 收集对数增殖期的AIA软骨细胞制成单细胞悬液,以 $2 \times 10^8$ /L的细胞密度接种于96孔板,分7组:正常组(正常大鼠关节软骨细胞)、AIA组(AIA大鼠关节软骨细胞未给予药物刺激)、环巴胺0.08、0.4、2、10、50  $\mu$ mol/L给药组(AIA大鼠关节软骨细胞加入5组不同浓度的环巴胺)。每孔100  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养48 h,弃培养液,加入不含血清的DMEM培养液培养12 h,弃培养液,各给药组再加入含不同浓度环巴胺(0.08、0.4、2、10、50  $\mu$ mol/L)的完全DMEM培养液培养44 h,7组均加入MTT(5 g/L)10  $\mu$ l/孔,孵育4 h,加入Formazan溶解液100  $\mu$ l/孔,光学显微镜下观察Formazan全部溶解后,用酶标仪在570 nm测定吸光度(absorbance, A)值A<sub>570</sub>。

**1.6 DNA琼脂糖凝胶电泳观察关节软骨细胞凋亡**

AIA关节软骨细胞以 $2 \times 10^8$ /L的密度接种于24孔板,分4组:AIA组、环巴胺0.4、2、10  $\mu$ mol/L给药组。每孔1 ml,培养48 h后弃培养液,加入含不同浓度环巴胺(0.4、2、10  $\mu$ mol/L)的完全DMEM培养液继续培养48 h,胰酶消化后将细胞转入离心管,1 500 r/min离心10 min,收集细胞。按试剂盒说明书操作进行DNA抽提后取5  $\mu$ l DNA在2%琼脂糖凝胶上进行电泳,凝胶成像观察并拍照。

**1.7 Hoechst 33342染色观察关节软骨细胞凋亡**

AIA关节软骨细胞以 $2 \times 10^8$ /L的密度接种于6孔板(孔内预置消毒过的盖玻片),分5组:正常组、AIA组、环巴胺0.4、2、10  $\mu$ mol/L给药组。每孔2 ml,培养48 h后弃去培养液,加入含不同浓度环巴胺(0.4、2、10  $\mu$ mol/L)的完全DMEM培养液继续培养48 h。PBS洗涤4%多聚甲醛固定0.1% TritonX通透,PBS洗涤,滴加入终浓度为10 mg/L的Hoechst 33342避光染色20 min,荧光显微镜下观察拍照。

**1.8 Annexin V-FITC/PI双染法检测关节软骨细胞凋亡率** 按1.7项进行细胞分组和药物处理,吸取上清液至离心管,贴壁细胞用PBS洗涤,胰酶消化后将细胞转入相应离心管,1 500 r/min离心10 min,收集细胞。PBS洗涤后加入400  $\mu$ l Annexin V

结合液悬浮细胞,再加入5  $\mu$ l Annexin V-FITC染色液,4  $^{\circ}$ C避光孵育15 min,再加入10  $\mu$ l PI染色液,4  $^{\circ}$ C孵育5 min,上流式细胞仪检测,采用WinMDI软件进行结果分析。

**1.9 RT-PCR检测关节软骨细胞中Shh、Gli1、Pth1、Bcl-2、Bax和Caspase-3 mRNA的表达** 按1.7项进行细胞分组和药物处理,采用TRIzol法提取细胞总RNA,按Fermentas试剂盒说明书进行逆转录。引物序列及退火温度(T<sub>m</sub>)如表1所示。PCR反应条件:94  $^{\circ}$ C预变性5 min,94  $^{\circ}$ C变性60 s,退火60 s,72  $^{\circ}$ C延伸60 s,35个循环;72  $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳,通过光密度扫描,凝胶成像拍照并用Labworks软件测定条带灰度值。

表1 引物序列

基因	引物序列 (5'-3')	产物大小 (bp)	基因库 序列号	T <sub>m</sub> ( $^{\circ}$ C)
Shh	F: GGAAGATCACAAGAACTCCGAAC R: GGATGCCGAGCTTTGGATTCATAG	354	NM_017221.1	59
Pth1	F: ACAACACCTGGACTCAGCACT R: ATTGAGCATTCTCTCCCAACT	322	NM_053566.1	56
Gli1	F: GTTTGAAGGCTGTCGGAAGTC R: AGTGGCTCTATTCTGGTGCT	158	NM_001191910.1	55
Bcl-2	F: GTATGATAACCGGGGATCG R: AGCCAGGAGAAATCAAACAG	612	NM_016993.1	58
Bax	F: AAGAAGCTGAGCGAGTGCT R: CAAAGATGGTCACTGTCTGC	361	NM_017059.2	59
Caspase-3	F: AAGCCGAAACTCTTCATC R: TGAGCATTGACACAATACAC	349	NM_012922.2	55
$\beta$ -actin	F: CAGTAACAGTCCGCTAGAA R: GATTACTGCTCTGGCTCTCA	175	NM_031144.3	55

**1.10 统计学处理** 采用SPSS 13.0软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间比较采用One-Way ANOVA检验。

## 2 结果

**2.1 大鼠关节软骨细胞的培养和鉴定** 光学显微镜下传1代的大鼠关节软骨细胞形态以梭形为主,胞质丰富,核为圆形或椭圆形,细胞周围可见具有折光性的细胞外基质(图1A)。免疫组化染色结果显示大鼠软骨细胞胞质被染成棕色,细胞生长越密集的地方染色越深,说明培养的关节软骨细胞中有II型胶原表达,证实本实验培养的细胞为关节软骨细胞(图1B)。甲苯胺蓝染色结果显示大鼠软骨细胞胞质被染成浅蓝色,胞核被染成深蓝色,可见有的软骨细胞为双核(图1C)。

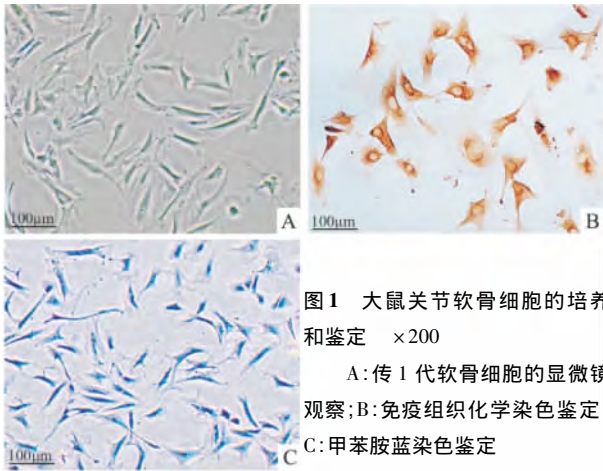


图1 大鼠关节软骨细胞的培养和鉴定 ×200

A: 传1代软骨细胞的显微镜观察; B: 免疫组织化学染色鉴定; C: 甲苯胺蓝染色鉴定

### 2.2 环巴胺对 AIA 关节软骨细胞增殖反应的影响

MTT 法检测体外给予环巴胺 (0.08、0.4、2、10、50 μmol/L) 48 h 后对 AIA 关节软骨细胞增殖的影响。AIA 组软骨细胞的增殖明显低于正常组 ( $F = 12.09, P < 0.01$ )。环巴胺体外给药能剂量依赖性提高 AIA 关节软骨细胞增殖, 其中 2、10、50 μmol/L 差异有统计学意义 ( $F = 12.09, P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 2。考虑到 0.08 μmol/L 作用不显著, 10、50 μmol/L 两个环巴胺浓度作用相当, 故取 0.4、2、10 μmol/L 3 个浓度进行下一步研究。

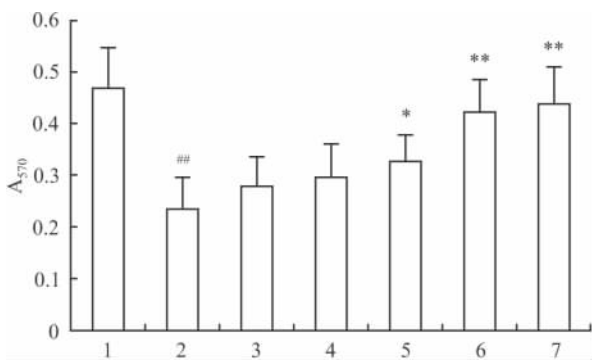


图2 环巴胺对 AIA 关节软骨细胞增殖的影响

1: 正常组; 2: AIA 组; 3: 环巴胺 0.08 μmol/L 给药组; 4: 环巴胺 0.4 μmol/L 给药组; 5: 环巴胺 2 μmol/L 给药组; 6: 环巴胺 10 μmol/L 给药组; 7: 环巴胺 50 μmol/L 给药组; 与正常组比较:  $## P < 0.01$ ; 与 AIA 组比较:  $* P < 0.05, ** P < 0.01$

### 2.3 DNA 电泳观察环巴胺抑制 AIA 关节软骨细胞凋亡

AIA 关节软骨细胞可见清晰、典型的凋亡细胞 DNA 梯状条带。环巴胺 0.4、2、10 μmol/L 给药组的 DNA 梯状条带均有不同程度地减少, 提示 AIA 软骨细胞存在明显的细胞凋亡, 而环巴胺处理能够有效减少软骨细胞凋亡。见图 3。

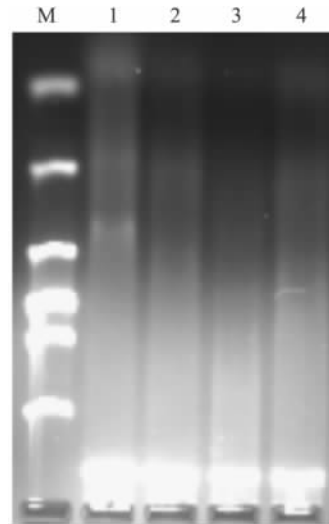


图3 DNA 电泳观察环巴胺抑制 AIA 关节软骨细胞凋亡

M: DNA Marker; 1: AIA 组; 2: 环巴胺 0.4 μmol/L 给药组; 3: 环巴胺 2 μmol/L 给药组; 4: 环巴胺 10 μmol/L 给药组

### 2.4 Hoechst 33342 染色观察环巴胺抑制 AIA 关节软骨细胞凋亡

各组细胞经 Hoechst 染色后, 荧光显微镜下可见正常组关节软骨细胞的细胞核多数呈均匀的蓝色荧光 (图 4A), AIA 组细胞存在核碎裂与染色质固缩, 表现出凋亡形态学改变 (图 4B), 表明与正常软骨细胞相比, AIA 关节软骨细胞存在异常凋亡过程。环巴胺给药组呈现较少的凋亡细胞形态学改变 (图 4C ~ E), 提示环巴胺对 AIA 关节软骨细胞起抗凋亡作用。

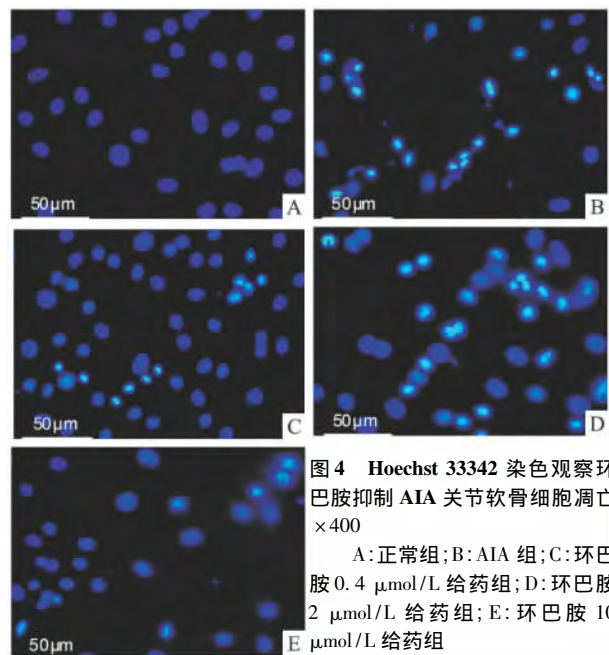


图4 Hoechst 33342 染色观察环巴胺抑制 AIA 关节软骨细胞凋亡 ×400

A: 正常组; B: AIA 组; C: 环巴胺 0.4 μmol/L 给药组; D: 环巴胺 2 μmol/L 给药组; E: 环巴胺 10 μmol/L 给药组

### 2.5 Annexin V-PI 双染检测环巴胺抑制 AIA 关节

软骨细胞凋亡 在双变量散点图上, FITC<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup> (Q1象限)表示死细胞, FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> (Q2象限)表示中晚期凋亡细胞, FITC<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup> (Q3象限)表示活细胞, FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> (Q4象限)表示早期凋亡细胞, Q2和Q4象限的细胞占全部细胞的比例代表细胞凋亡率(%). 定量分析结果显示, 与正常组相比, AIA组凋亡率明显增高 ( $F = 7.665, P < 0.01$ ); 环巴胺(0.4、2、10  $\mu\text{mol/L}$ )能剂量依赖性地减少AIA关节软骨细胞的凋亡率, 其中2、10  $\mu\text{mol/L}$ 差异有统计学意义 ( $F = 7.665, P < 0.05, P < 0.01$ ). 见图5。

**2.6 环巴胺对AIA关节软骨细胞Hh信号通路与凋亡相关基因mRNA表达的影响** PCR扩增后所获目的基因、 $\beta$ -actin的产物均与预期一致, 典型的电泳图片(图6A、B)。半定量分析结果表明: 与正常组相比, AIA组关节软骨细胞中Hh信号通路相

关基因(Shh、Ptc1、Gli1)mRNA表达显著升高 ( $F = 16.61、8.30、22.11, P < 0.01$ ), 表明AIA关节软骨细胞Hh信号通路明显活化, 环巴胺体外给药能降低AIA关节软骨细胞上述基因的表达, 抑制Hh通路的过度活化; 同时, AIA关节软骨细胞中抗凋亡基因Bcl-2 mRNA的表达显著下降 ( $F = 22.16, P < 0.01$ ), 而促凋亡基因Bax和Caspase-3 mRNA的表达明显升高 ( $F = 3.376、3.147, P < 0.05, P < 0.01$ ), 环巴胺体外给药能够提高Bcl-2 mRNA表达, 并降低Bax和Caspase-3 mRNA表达, 这可能与环巴胺抗AIA关节软骨细胞凋亡的作用密切相关。

3 讨论

关节软骨细胞是关节软骨中的唯一细胞类型, 参与调节关节软骨的损伤及重塑过程, 维持软骨组

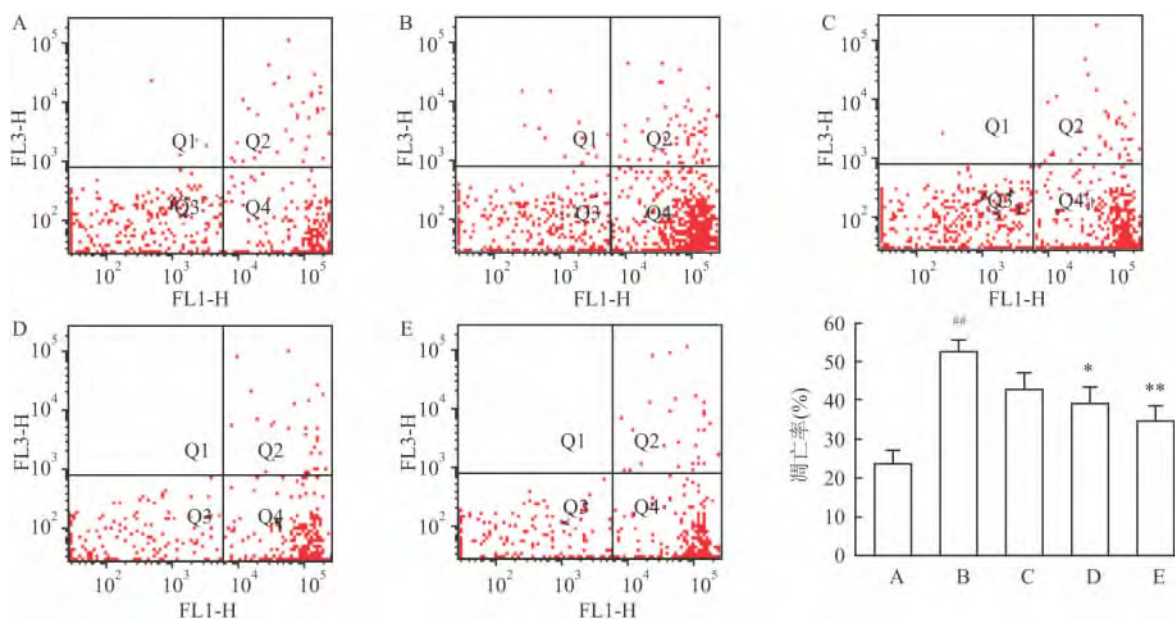


图5 Annexin-V FITC/PI双染检测环巴胺抑制AIA关节软骨细胞凋亡

A: 正常组; B: AIA组; C: 环巴胺0.4  $\mu\text{mol/L}$  给药组; D: 环巴胺2  $\mu\text{mol/L}$  给药组; E: 环巴胺10  $\mu\text{mol/L}$  给药组; 与正常组比较: <sup>##</sup>  $P < 0.01$ ; 与AIA组比较: <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$

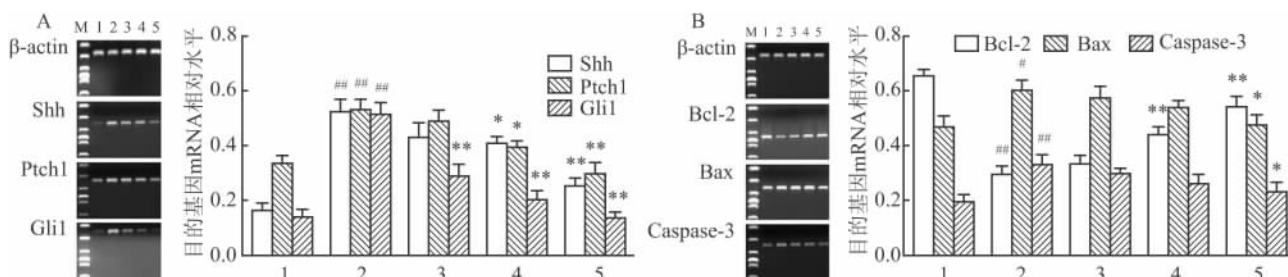


图6 环巴胺对AIA关节软骨细胞Hh信号通路与凋亡相关基因mRNA表达的影响

A: Shh、Ptc1和Gli1 mRNA的典型电泳图; B: Bcl-2、Bax和Caspase-3 mRNA的典型电泳图; M: DNA Marker; 1: 正常组; 2: AIA组; 3: 环巴胺0.4  $\mu\text{mol/L}$  给药组; 4: 环巴胺2  $\mu\text{mol/L}$  给药组; 5: 环巴胺10  $\mu\text{mol/L}$  给药组; 与正常组比较: <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , <sup>##</sup>  $P < 0.01$ ; 与AIA组比较: <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$



织乃至关节的内环境稳定,其功能异常在 RA 致残的病理进程中起着病变节点的关键介导作用<sup>[10]</sup>。RA 患者关节软骨细胞存在过度凋亡,抑制其过度凋亡对 RA 骨损伤和骨侵蚀有保护意义<sup>[11-12]</sup>。研究<sup>[4-5]</sup>证实 Hh 信号通路通过甲状旁腺素相关肽负反馈调节和 Hh 直接作用的双重模式影响关节软骨细胞的生物学行为,为此,本研究建立 AIA 大鼠模型,分离培养关节软骨细胞,以 Hh 信号通路阻断剂环巴胺作为实验药物,观察体外干预 AIA 关节软骨细胞 Hh 信号通路对细胞增殖和凋亡的影响及其可能机制。

本研究采用 MTT 法观察了环巴胺体外给药对 AIA 关节软骨细胞增殖的影响,结果显示环巴胺(0.08、0.4、2、10、50  $\mu\text{mol/L}$ )体外给药能剂量依赖性地提高 AIA 关节软骨细胞增殖,提示环巴胺对 AIA 关节软骨细胞的增殖有明显的促进作用。DNA 电泳是检测凋亡发生时 DNA 片段或多聚体组成的寡核苷酸片段的标准方法,其典型结果是“梯状带”。AIA 关节软骨细胞可见典型的 DNA 梯状条带,环巴胺(0.4、2、10  $\mu\text{mol/L}$ )体外作用 48 h 后的梯状条带明显减少,大多仅见离点样孔不远的基因组 DNA,以环巴胺 2  $\mu\text{mol/L}$  最明显。Hoechst 33342 为特异性 DNA 染料,采用荧光显微镜观察细胞核染色质的形态学改变评判细胞凋亡情况。本实验中正常组细胞呈均质蓝色荧光,而 AIA 关节软骨细胞皱缩明显,细胞核呈不同程度的致密浓染或碎块状,染色质固缩、聚集,存在细胞凋亡的典型形态学改变;环巴胺给药组的均匀蓝色荧光的细胞数量增多,凋亡细胞数相对减少。采用 Annexin-V FITC/PI 双染法进一步检测了环巴胺对 AIA 关节软骨细胞的抗凋亡作用,结果表明 AIA 关节软骨细胞的凋亡率与正常组相比显著增高,环巴胺(0.4、2、10  $\mu\text{mol/L}$ )能剂量依赖性地减少 AIA 关节软骨细胞的凋亡细胞率。上述结果均提示 AIA 关节软骨细胞存在明显的细胞凋亡过程,而环巴胺体外给药能有效抑制其过度凋亡。

哺乳动物的 Hh 信号通路包括 4 个部分:Hh 蛋白、跨膜受体 Ptch 和 Smo、核转录因子 Glis、下游靶基因<sup>[13]</sup>。RT-PCR 结果表明 AIA 关节软骨细胞中 Shh、Ptch1、Gli1 mRNA 的水平均较正常组显著升高,表明 Hh 信号通路存在异常激活或传导异常,环巴胺体外给药能明显降低上述基因的表达水平,有效抑制该通路过度活化,这可能与环巴胺促进 AIA 关节软骨细胞增殖、抑制其过度凋亡密切相关。

细胞凋亡是由多种基因参与的复杂网络系统,与细胞增殖和癌变有关的癌基因和抑癌基因都参与了对凋亡的调控。Bcl-2 基因家族中的 Bcl-2 和 Bax 基因与细胞凋亡的关系倍受关注,其中 Bax 促进细胞凋亡,而 Bcl-2 能延长细胞生存,抑制细胞凋亡<sup>[14]</sup>。Caspase-3 是各条凋亡通路作用的枢纽,是细胞凋亡的执行人,可导致细胞结构的全面解体,抑制 Caspase-3 酶活性或拮抗 Caspase-3 功能可使细胞凋亡受抑制<sup>[15]</sup>。有文献<sup>[11]</sup>证实,RA 关节软骨组织中 Bcl-2 蛋白表达明显降低,密切参与 RA 关节软骨的异常凋亡过程。与其一致,本实验结果表明,AIA 关节软骨细胞中 Bcl-2 mRNA 表达显著下降,而 Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达明显升高,环巴胺体外给药能上调 Bcl-2 mRNA 表达,抑制 Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达,进而发挥其抗凋亡作用。

综上所述,Hh 信号通路阻断剂环巴胺体外能促进 AIA 关节软骨细胞的增殖,并抑制其过度凋亡,该抗凋亡作用和调节 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的表达密切相关,提示干预关节软骨细胞 Hh 信号通路对保护 RA 关节软骨具有潜在的治疗意义。

#### 参考文献

- [1] McInnes I B, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(23): 2205-19.
- [2] Marotte H, Gineys E, Miossec P, et al. Effects of infliximab therapy on biological markers of synovium activity and cartilage breakdown in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(7): 1197-200.
- [3] Aletaha D, Funovits J, Smolen J S. Physical disability in rheumatoid arthritis is associated with cartilage damage rather than bone destruction [J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(5): 733-9.
- [4] Day T F, Yang Y. Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2008, 90 Suppl 1: 19-24.
- [5] Mak K K, Bi Y, Wan C, et al. Hedgehog signaling in mature osteoblasts regulates bone formation and resorption by controlling PTHrP and RANKL expression [J]. *Dev Cell*, 2008, 14(5): 674-88.
- [6] Lin A C, Seeto B L, Bartoszko J M, et al. Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis [J]. *Nat Med*, 2009, 15(12): 1421-5.
- [7] Wei F, Zhou J, Wei X, et al. Activation of Indian hedgehog promotes chondrocyte hypertrophy and upregulation of MMP-13 in human osteoarthritic cartilage [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, 20(7): 755-63.
- [8] 李荣,李俊,石静波,等. 7,3'-二甲氧基橙皮素对佐剂性关节炎大鼠免疫功能的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(9): 1058-62.

- [9] Yuan F L , Chen F H , Lu W G , et al. Inhibition of acid-sensing ion channels in articular chondrocytes by amiloride attenuates articular cartilage destruction in rats with adjuvant arthritis [J]. *Inflamm Res* , 2010 , 59(11) : 939 - 47.
- [10] Schett G , Stach C , Zwerina J , et al. How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum* , 2008 , 58(10) : 2936 - 48.
- [11] Kim H A , Song Y W. Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum* , 1999 , 42(7) : 1528 - 37.
- [12] Yatsugi N , Tsukazaki T , Osaki M , et al. Apoptosis of articular chondrocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: correlation of apoptosis with degree of cartilage destruction and expression of apoptosis-related proteins of p53 and c-myc [J]. *J Orthop Sci* , 2000 , 5(2) : 150 - 6.
- [13] Wilson C W , Chuang P T. Mechanism and evolution of cytosolic Hedgehog signal transduction [J]. *Development* , 2010 , 137(13) : 2079 - 94.
- [14] Li R , Cai L , Xie X F , et al. 7- $\beta$ -dimethoxy hesperetin induces apoptosis of fibroblast-like synoviocytes in rats with adjuvant arthritis through Caspase-3 activation [J]. *Phytother Res* , 2010 , 24(12) : 1850 - 6.
- [15] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis [J]. *Nature* , 2000 , 407(6805) : 770 - 6.

## Effects of cyclopamine on the proliferation and apoptosis of chondrocytes in adjuvant-induced arthritis rats and its anti-apoptotic mechanisms

Ding Jing<sup>1</sup> , Li Rong<sup>2</sup> , Hu Xiangyang<sup>1</sup> , et al

(<sup>1</sup>Dept of Pathology , <sup>2</sup>College of Pharmacy , Anhui Medical University , Hefei 230032)

**Abstract Objective** To explore the effects of cyclopamine , a hedgehog (Hh) signal pathway inhibitor , on the proliferation and apoptosis of articular chondrocytes in adjuvant-induced arthritis (AIA) rats and its anti-apoptotic mechanisms. **Methods** Freund's complete adjuvant was used to induce AIA. Articular chondrocytes were isolated and cultured by trypsin and collagenase digestion method. AIA articular chondrocytes were treated by cyclopamine *in vitro*. The cell proliferation was detected by MTT assay. The cell apoptosis was evaluated with DNA agarose gel electrophoresis , hoechst staining and flow cytometry analysis. The levels of Shh , Ptch1 , Gli1 , Bcl-2 , Bax and Caspase-3 mRNA were detected by RT-PCR. **Results** Cyclopamine (0.08 , 0.4 , 2 , 10 , 50  $\mu\text{mol/L}$ ) could increase AIA articular chondrocytes proliferation in a dose-dependent. DNA ladder pattern was formed typically in AIA articular chondrocytes , while cyclopamine (0.4 , 2 , 10  $\mu\text{mol/L}$ ) treatment could reduce the formation of DNA ladder. AIA articular chondrocytes displayed nuclei fragmentation with condensed chromatin and cyclopamine could promote the number of uniform blue fluorescent cells. Flow cytometry analysis also indicated cyclopamine could visibly reduce the rate of apoptotic cells in AIA articular chondrocytes. Compared with normal group , the levels of Hh pathway-related genes (Shh , Ptch-1 and Gli1) mRNA apparently increased in AIA articular chondrocytes. Anti-apoptotic gene Bcl-2 mRNA level significantly decreased , while pro-apoptotic genes Bax and Caspase-3 mRNA levels were significantly increased. Cyclopamine treatment could inhibit the excessive activation of Hh pathway , up-regulate Bcl-2 mRNA expression , and reduce Bax and Caspase-3 mRNA expressions. **Conclusion** Cyclopamine could promote the proliferation and inhibit excessive apoptosis of AIA articular chondrocytes , which might be related to regulation of Bcl-2 , Bax , and Caspase-3 expressions. Our results suggest that intervention of Hh signal in articular chondrocytes has potential therapeutic significance for articular cartilage protection in rheumatoid arthritis.

**Key words** hedgehog signal pathway; cyclopamine; adjuvant-induced arthritis; articular chondrocytes; proliferation; apoptosis